

## 明細書

クモ糸タンパク質を含む絹糸および該絹糸を産生するカイコ

### 5 技術分野

本発明は、遺伝子組換えカイコにより作られるクモ糸タンパク質を含む絹糸、該遺伝子組換えカイコ、ならびに該遺伝子組換えカイコによる絹糸の製造方法に関する。

### 10 背景技術

強度および耐久性を損なうことなく、軽量かつしなやかさの両方を兼ね備える材料および布についての需要は常に増加しており、クモ糸が数々の所望される特性を有することが示されている。円網を作る種類のクモは、6本の異なる種類の腺組織からシルクを産生することができ、6本の繊維の各々は異なる機械的特性を有することが知られている。Major amullate gland（大囊状腺）と Minor amullate gland（小囊状腺）から作り出されるクモ糸（スパイダーシルク）は、牽引糸、ドラグラインと呼ばれている。牽引糸は高い引っ張り強度と高い伸度を示す（非特許文献1）ことから、幅広い産業用途への展開が期待されている（非特許文献2）。また、Flagelliform gland（鞭毛状腺）、Aggregate gland（聚状腺）から作られるクモ糸は、一般に横糸となり、粘着性と高い伸度を示す（非特許文献3）。

このようにクモ糸は、鋼鉄よりも強い引張強さを示すものおよび羊毛よりも強い耐屈曲性を有するものがあり、さらにKEVLAR（登録商標）よりも大きなエネルギー対ブレイク限界を特徴とするものも知られている。特に牽引糸は200 k s iを越える引張強さを有し、ほぼ35%の耐屈曲性を伴う。これらの特徴が付与されるとすると、クモ糸を様々な織物用適用のための軽量高強度繊維として使用することができる。

またクモ糸は、最高100℃まで安定であるため、これらの繊維を使用して熱

注入化プラスチックを補強することができる。これらのタンパク質はフィルムもしくはコーティングの形態でも価値がある可能性がある。さらに、クモ糸はアミノ酸を構成成分とするタンパク質でもあり、自然界において分解されるという利点も兼ね備えている。

- 5 天然のクモ糸タンパク質としては、spidroin1 (MaSpI) や spidroin2 (MaSpII) (非特許文献4)、ADF-3、ADF-4 などが知られている。これらクモ糸タンパク質の持つ特徴的な配列として、アラニン、セリン、およびグリシンにより大半が占められるアミノ酸でできており、かつグルタミン、チロシン、ロイシン、およびバリンのような他のアミノ酸の相当な量を有することが挙げられる。spidroin1
- 10 は反復配列を有しており、反復単位は最大34アミノ酸長であり、そして厳密には保存されない。この反復単位は2つの異なるセグメント、つまり (i) 5~7 残基のポリアラニン配列により大半が占められる10アミノ酸セグメント、(i i) 配列内で保存されるが、ただし多くの反復単位中に複数回の3アミノ酸の欠損を有する24アミノ酸セグメント、からなる。後者の配列は主に Gly-Xaa-Gly
- 15 モチーフからなり、Xaa はアラニン、チロシン、ロイシン、もしくはグルタミンである。Spidroin2 も反復配列を有し、反復単位は最大51アミノ酸長であり、そしてやはり厳密には保存されない。この反復配列は2つの異なるセグメント、つまり (i) 6~9 残基のポリアラニン配列により大半が占められるセグメント、(i i) GlyGlyTyrGlyProGly もしくは GlyProGlyGlnGln といったアミノ酸配列を
- 20 含むセグメント、からなる。

- 天然のクモ糸タンパク質とくに牽引糸の主要構成タンパク質である spidroin1 は、グリシン、セリン、グルタミン、アラニン、チロシン、ロイシン、アルギニン、イソロイシン、バリンを構成成分とするポリペプチドからなることが知られている。マイナー成分である spidroin2 の配列中には、spidroin1 と比較してプ
- 25 ロリンが多く含まれることが知られており、プロリンはターンおよびよじれ構造に寄与すると考えられている。

これらの特徴を保持した人工的に合成、デザインされた遺伝子として、それぞれ DP-1B、DP-2A (非特許文献4) が知られている。

しかしクモは集団で飼育することが困難であり、直接クモから大量の糸を調製することは困難である。また、天然のクモ糸を可溶化および精製することもまた困難で、クモ糸は例えば  $\text{LiSCN}$ 、 $\text{LiClO}_4$ 、もしくは 88% (vol/vol) のギ酸のような非常に苛酷な試薬以外では不溶性である。いったん溶解しても、透析する場合、もしくは典型的な緩衝液で希釈する場合にクモ糸を構成しているクモ糸タンパク質は沈殿してしまう。さらに、クモにより作られるクモ糸は、クモ糸の種類に応じて糸の性質が異なっており、所望の性質を持つクモ糸を分離することはなお困難である。こうした要因により、商業的に有用な量のクモ糸タンパク質を天然の源から適度なコストで入手することを不可能なものとしている。

そこで近年は遺伝子組換え技術を用いて、いくつかの生物を、クモ糸タンパク質を作るように改変する試みがなされている。例えば大腸菌や酵母といった微生物にクモ糸タンパク質を作らせる試み（非特許文献 4）（特許文献 1）や、タバコやポテトといった植物を用いる試み（非特許文献 5）、ほ乳類細胞を用いる手法や、遺伝子組換えヤギを用いて乳中や尿中に産生させる手法（特許文献 2）が行われている。しかしこれら遺伝子組換え体を用いたクモ糸タンパク質の産生では、産生されたクモ糸タンパク質を抽出、精製し、人工的に紡糸する必要がある（非特許文献 1）、人工的な紡糸には手間やコストがかかり、各種溶媒を用いることによる環境負荷の課題もある。

そうした中、精製および／または人工的な紡糸工程を必要とせず、クモ糸を構成するタンパク質を含む繊維を直接生産するための方法として、遺伝子組換えカイコを用いた緑色蛍光タンパク質とクモ糸タンパク質の融合タンパク質を含んだ絹糸を生産する手法が開示されている（特許文献 3）。この手法は、カイコ卵へ、エレクトロポレーションにより緑色蛍光タンパク質とクモ糸タンパク質を模したタンパク質の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入し、相同組換えにより組換え体を取得するものである。しかしこの手法では、遺伝子を組換えていないカイコの作る絹糸と比較して、強度および伸度が低下した絹糸しか生産することができない。

この原因として、1. 相同組換えにより遺伝子を導入することから、カイコの持つ本来の一对のフィブロインH鎖遺伝子の少なくとも一方が破壊されてしまう、2. 組換え体選抜のため、緑色蛍光タンパク質を融合タンパク質として発現させる必要があり、クモ糸タンパク質の性質を損なう可能性がある、3. デザインされたクモ糸タンパク質が高強度、高伸度といった性質を持ち得ない配列であった、  
5 などの可能性が考えられる。

【特許文献1】特表平8-511426号公報

【特許文献2】特表2002-506642号公報

【特許文献3】国際公開第02/40528号パンフレット

10 【非特許文献1】Science、2002年、第295巻、p472-476

【非特許文献2】Nature、2001年、第410巻、p541-548

【非特許文献3】大崎茂芳、クモの糸の化学、有機合成化学、(日本)、1985年、第4巻、第9号、p828-835

15 【非特許文献4】Reviews in Molecular Biotechnology、2000年、第74号、p105-119

【非特許文献5】Nature、2001年、第19巻、p573-577

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

20 本発明では、高強度、高伸度といったクモ糸の持つ所望の性質を有する絹糸を、各種溶媒を用いることなく、また人工的な紡糸工程を必要としない手法により提供することを課題としている。

### 課題を解決するための手段

25 本発明者らは、上記課題を解決できる手段を鋭意検討した結果、トランスポゾンの機能を用いることでクモ糸タンパク質をコードする遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコが、高強度、高伸度といった所望の性質を持つ、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生することを見出し本発明に至った。

すなわち本発明は、以下の（１）～（２６）の発明を提供するものである。

（１）一対のフィブロインH鎖遺伝子をもつ遺伝子組換えカイコにより作られる、クモ糸タンパク質を含む絹糸。

（２）一対のフィブロインH鎖遺伝子をもつ遺伝子組換えカイコにより作られ、  
5 絹糸のフィブロインH鎖タンパク質の基本的な構造を本質的に保持することを特徴とするクモ糸タンパク質を含む絹糸。

（３）クモ糸タンパク質がフィブロインタンパク質中に分散して存在することを特徴とする前記発明（１）または（２）に記載の絹糸。

（４）クモ糸タンパク質がフィブロインH鎖タンパク質に含まれるポリペプチド  
10 と融合していることを特徴とする前記発明（１）～（３）のいずれかに記載の絹糸。

（５）クモ糸タンパク質が、フィブロインH鎖タンパク質のN末端部分とC末端部分の間に挿入されており、C末端部分に含まれるシステインを介してフィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合していることを特徴とする前記発明  
15 （４）に記載の絹糸。

（６）クモ糸タンパク質の含量が０．１～２５重量％である前記発明（１）～（５）のいずれかに記載の絹糸。

（７）クモ糸タンパク質の含量が１～１５重量％である前記発明（６）に記載の絹糸。

（８）クモ糸タンパク質の含量が１～１０重量％である前記発明（７）に記載の絹糸。  
20

（９）クモ糸タンパク質が、配列番号１のペプチドまたは配列番号１において１もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする前記発明（１）～（８）のい  
25 ずれかに記載の絹糸。

（１０）前記発明（９）に記載のペプチドが３～３０回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする前記発明（９）に記載の絹糸。

（１１）前記発明（９）に記載のペプチドが４～１６回繰り返したクモ糸タンパ

ク質を含むことを特徴とする前記発明（１０）に記載の絹糸。

（１２）クモ糸タンパク質が、配列番号２のペプチドまたは配列番号２において  
１もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパ  
ク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする前記発明（１）～（８）の  
5 いずれかに記載の絹糸。

（１３）前記発明（１２）に記載のペプチドが３～３０回繰り返したクモ糸タン  
パク質を含むことを特徴とする前記発明（１２）に記載の絹糸。

（１４）前記発明（１２）に記載のペプチドが４～１６回繰り返したクモ糸タン  
パク質を含むことを特徴とする前記発明（１３）に記載の絹糸。

10 （１５）クモ糸タンパク質が前記発明（９）記載のペプチドおよび前記発明（１  
２）記載のペプチドの両方を含むことを特徴とする前記発明（１）～（８）のい  
ずれかに記載の絹糸。

（１６）クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分  
が配列番号３のペプチドまたは配列番号３において１もしくはそれ以上のアミノ  
15 酸が欠失、置換もしくは付加されかつ２または３個のシステインを有するペプチ  
ドであることを特徴とする前記発明（５）～（１５）のいずれかに記載の絹糸。

（１７）クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のN末端部分  
が配列番号４のペプチドまたは配列番号４において１もしくはそれ以上のアミノ  
酸が欠失、置換もしくは付加されされたペプチドであって、該ペプチドをコード  
20 する遺伝子がプロモーターによる外来タンパク質の発現を増強する機能を保持す  
るペプチドであることを特徴とする前記発明（５）～（１６）のいずれかに記載  
の絹糸。

（１８）クモ糸タンパク質が選択マーカーとなるタンパク質と融合していない前  
記発明（１）～（１７）のいずれかに記載の絹糸。

25 （１９）一対のフィブロインH鎖遺伝子を有し、クモ糸タンパク質をコードする  
遺伝子が一対のフィブロインH鎖遺伝子以外の領域に導入された前記発明（１）  
～（１８）のいずれかに記載の絹糸を作る遺伝子組換えカイコ。

（２０）遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィ

ブロインH鎖遺伝子プロモーターを有することを特徴とする前記発明（19）に記載の遺伝子組換えカイコ。

5 （21）遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーター及びその上流領域を有することを特徴とする前記発明（19）に記載の遺伝子組換えカイコ。

（22）フィブロインH鎖プロモーター下流に、フィブロインH鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン全長またはその一部・第二エキソン領域の一部が連結されていることを特徴とする前記発明（20）または（21）に記載の遺伝子組換えカイコ。

10 （23）トランスポゾンを利用する前記発明（19）～（22）のいずれかに記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

（24）トランスポゾンが piggyBac トランスポゾンであることを特徴とする前記発明（23）に記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

15 （25）前記発明（19）～（22）のいずれかに記載の遺伝子組換えカイコにより作らせることを特徴とする絹糸の製造方法。

（26）前記発明（1）～（18）のいずれかに記載の絹糸を用いた織物。

#### 発明の効果

20 本発明により、強度、伸度及び／またはタフネスが向上するといった、優れた特性を有するクモ糸タンパク質を含む絹糸が得られた。また、該絹糸を用いた織物は、その優れた特性から、産業用途例えば、航空、宇宙用途、被服製造、ロープ、外科手術用縫合糸のような所定の種類の高強度使用のため、ならびに移植術（例えば、人工靱体もしくは大動脈用包帯）用の生物材料としてさえ適用可能である可能性がある。

25

#### 図面の簡単な説明

図1は、HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC および HP・AEX・HC 遺伝子構造の作製手法を示す図である。

図 2 は、HUP・DP8・HC および HUP・DP4・HC 遺伝子構造の作製手法を示す図である。

図 3 は、HP・DP8・HC（レーン 1～5）、HP・DP4・HC（レーン 6～10）遺伝子構造をもつ遺伝子組換えカイコをランダムに選抜し、そのゲノムを EcoRI で制限酵素処理したものに対し、クモ糸タンパク質遺伝子 DP を標識して行ったサザンハイブリダイゼーションの結果を示した写真図である。

図 4 は、HP・DP16・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC 遺伝子構造を導入したカイコの作る繭を、可溶化し、銀染色および抗体を用いたウエスタン解析により分析した結果を示した写真図である。

図 5 は、非組換えカイコの作る絹糸と、HP・DP8・HC 遺伝子を導入した組換えカイコの作る絹糸の精練前および精練後の状態を走査電子顕微鏡（1500倍）により撮影した結果を示す写真図である。

図 6 は、非組換えカイコの作る絹糸をサンプルとし、繊維軸方向に切片を切り、クモ糸タンパク質 DP に対する抗体を用いて行った免疫電子顕微鏡観察写真の結果を示す写真図である（倍率 15000 倍）。

図 7 は、HP・DP8・HC 遺伝子を導入した組換えカイコの作る絹糸をサンプルとし、繊維軸方向に切片を切り、クモ糸タンパク質 DP に対する抗体を用いて行った免疫電子顕微鏡観察写真の結果を示す写真図である（倍率 15000 倍）。

## 20 符号の説明

- 1 : セリシン層
- 2 : フィブロイン層
- 3 : クモ糸タンパク質

## 25 発明を実施するための最良の形態

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば



容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

本発明における絹糸とは、カイコガ（ボンビクス・モリ）により吐糸される繭を構成するタンパク質を主な主成分とする繊維を示す。好ましくは繭から調製された生糸を示し、さらに好ましくは生糸を精練して得られた絹糸を示し、もっとも好ましくは2粒以上の複数の繭からマルチフィラメントとして操糸された絹糸を示す。カイコの作る絹糸は、フィブロイン層とそれを取り囲むセリシン層から構成されている。

本発明における「クモ」とは、クモ目に分類される動物、好ましくは造網性のクモ目に分類される動物を示す。さらに好ましくはオニグモもしくはジョロウグモを示す。

本発明における「クモ糸」とは、「クモ」が作る糸すなわち繊維状のタンパク質であり、具体的には造網性のクモの作る糸すなわち牽引糸、粹糸、繫留糸、卵囊糸、横糸、捕獲帯、付着盤、しおり糸などが挙げられるが、より好ましくは縦糸、横糸、粹糸、牽引糸を示す。

本発明におけるクモ糸タンパク質とは、クモ糸を構成するタンパク質もしくはクモ糸を構成するタンパク質の特徴を持つタンパク質のことである。天然のクモ糸タンパク質と全く同じ配列である必要はなく、人工的にデザイン、合成されたタンパク質であっても良い。天然のクモ糸タンパク質は分子量が巨大であることから、天然のクモ糸タンパク質を作る遺伝子も同様に巨大である。効率的に取り扱うためには、遺伝子の短縮、欠失、置換を行うことが望ましい。また、天然のクモ糸タンパク質の持つ特徴的な配列を持つ人工的な類似タンパク質を作るように設計、デザインされた人工的な遺伝子であっても良い。

好ましくは、DP-1B、DP-2A に含まれる少なくともアミノ酸5残基以上の配列を持つタンパク質をクモ糸タンパク質として用いることができる。さらに好ましく

は、クモ糸索引糸のもつ強度、伸度といった所望の性質を絹糸に付与するには、主要構成タンパク質である spidroin1 のアミノ酸配列を模倣することが望ましい。つまり本発明におけるクモ糸タンパク質は、グリシン、セリン、グルタミン、アラニン、チロシン、ロイシン、アルギニン、イソロイシン、バリンを構成成分とすることが望ましく、さらに好ましくは DP-1B によりコードされる配列番号 1 に記載の配列、または「クモ糸タンパク質に特有の反復配列」・「DP-2A のコンセンサス配列」・「絹糸に特有の反復配列」の順で構成された配列番号 2 に記載の配列を含むクモ糸タンパク質が用いられる。

実質的に同等の機能を有する範囲における、配列番号 1 または 2 または 3 または 4 に記載の配列において 1 またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加を有するものも含まれる。すなわち、タンパク質は、種々の方法により改変されても、その基本的な特徴を保持することが十分に認識されている。このことは、基本となるポリペプチド配列に比較して 1 またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換または付加といった変異が存在するが、基本となる無変位配列と同等の機能すなわち所望の性質を保持していることを意味する。

また遺伝子組換えカイコを用いて効率的にクモ糸タンパク質を作らせるためには、カイコ絹糸腺で発現する遺伝子のコドン利用頻度に近い遺伝子であることが望ましい。カイコ絹糸腺で発現する遺伝子の例としては、フィブロイン H 鎖遺伝子、フィブロイン L 鎖遺伝子、P25 タンパク質遺伝子などが挙げられる。カイコ絹糸腺で発現する遺伝子のコドン利用頻度に近づくよう改変、変異させることができ、その手段は公知である。具体的にはタンパク質を作る遺伝子を改変する手法が用いられる。例えば、ランダム変異導入法、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせで行うことができる。例えば亜硫酸水素ナトリウムを用いた化学的な処理によりシトシン塩基をウラシル塩基に置換する方法や、マンガンを含む反応液中で PCR を行い、DNA 合成時のヌクレオチドの取り込みの正確性を低くする方法、部位特異的変異導入のための市販されている各種キットを用いることもできる。例えば Sambrook 等編 [Molecular Cloning-A Laboratory Manual、第 2 版] Cold

Spring Harbor Laboratory、1989、村松正實編 [ラボマニュアル遺伝子工学] 丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E. 編 [PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用] ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができる。

- 5      本発明において、クモ糸タンパク質は、絹糸構成タンパク質であるフィブロインH鎖に含まれるポリペプチドと融合していることが望ましい。好ましくは、クモ糸タンパク質はフィブロインH鎖のC末端部分と融合している。特に好ましくは、クモ糸タンパク質はフィブロインH鎖のN末端部分とフィブロインH鎖のC末端部分の間に挿入されている。この様に構成されたクモ糸タンパク質を含む融合タンパク質は、フィブロインH鎖タンパク質のC末端部分に含まれるシステインを介して、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成する。
- 10

本発明において用いられるクモ糸タンパク質の分子量に関しては、特に制限はない。クモ糸の持つ所望の性質を付与するためには分子量は高いことが望ましいが、同時にクモ糸タンパク質を作る遺伝子の取り扱いを困難にする。したがって

15      クモ糸タンパク質は、好ましくは分子量 30kDa～300kDa の範囲、さらに好ましくは 30kDa～160kDa の範囲であることが望ましい。

本発明の絹糸は、クモ糸の持つ優れた性質によって改良された性質を持つ。より具体的には遺伝子を組換えていない同種カイコの作る絹糸と比較して高い引張強度や高伸度、高弾性率や伸縮性に優れる点、耐屈曲性、大きなエネルギー対ブレーク限界すなわち高いタフネス性、粘着性、含水時の収縮性、耐候性や耐光性に優れる点などから選ばれる少なくとも一つの特徴を示すが、それら全てを満たすことを意味するものではない。好ましくは高い引っ張り強度や高伸度、高いタフネス性の中から選ばれる少なくとも一つの性質を示す。

20

本発明において、クモ糸タンパク質を含む絹糸をカイコに産生させるために用いるプロモーターは特に限定されないが、転写活性の高いものが好ましい。例えば、特開平6-261770や特開昭62-285787に記載されているショウジョウバエの熱ショックタンパク質遺伝子のプロモーターやカイコアクチン遺伝子のプロモーター (Nature Biotechnology 18, 81-84, 2000) などが挙げられる

25

が、フィブロインH鎖遺伝子のプロモーター (GenBank 登録番号 V00094 の塩基番号 255~574 番目、GenBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 62118~62437 番目)、フィブロインL鎖遺伝子のプロモーター (Gene, 100:151-158:GenBank 登録番号 M76430)、セリシン遺伝子のプロモーター (GenBank 登録番号 AB007831 の塩基番号 599~1656 番目) などカイコ絹糸腺細胞中で高い転写促進活性を有するプロモーターが好適である。また、フィブロインH鎖遺伝子プロモーターおよびその上流領域 (GenBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 57444~62437 番目) を用いることで高い転写促進がみられる。

フィブロインH鎖遺伝子の 5' 末端部分は、プロモーターによる外来タンパク質の発現を増強する作用を有する DNA 配列である。この DNA 配列は、フィブロインH鎖遺伝子の第1エクソンと第1イントロン全長またはその一部および第2エクソンの一部を含む。また、フィブロインH鎖遺伝子の 5' 末端部分は配列番号 4 記載のフィブロインH鎖タンパク質N末端部分のポリペプチドをコードする。

カイコの形質転換のためには、昆虫細胞を遺伝子組換えすることのできる昆虫用のベクターであれば特段の制限なく使用することができる。例えば、カイコ核多角体ウイルス (BmNPV) ベクターや、昆虫由来 DNA 型トランスポゾンを組み込んだプラスミドベクター等であるが、特に後者が好ましい。昆虫由来 DNA 型トランスポゾンとしては、piggyBac、mariner (Insect Mol. Biol. 9, 145-155, 2000)、および Minos (Insect Mol. Biol. 9, 277-281, 2000) 等が知られているが、本発明においては piggyBac が好ましい。

PiggyBac トランスポゾンとは、両端に 13 塩基対の逆位配列と、内部に約 2.1k 塩基対の ORF を有する DNA の転位因子である。本発明において使用される PiggyBac トランスポゾンは特に限定されないが、例えば *Trichoplusia ni* cell line TN-368、*Autographa californica* NPV (AcNPV)、*Galleria mellonea* NPV (GmMNPV) 由来のものを用いることができる。好ましくは *Trichoplusia ni* cell line TN-368 由来 PiggyBac の一部を持つプラスミド pHA3PIG と pPIGA3GFP (Nature biotechnology 18, 81-84, 2000) を、トランスポゼースタンパク質を産生するヘルパープラスミドとして用いることができる。

ヘルパープラスミドによって産生されるこれらのトランスポゾン、カイコ細胞内で転移活性を示すことから、これらの DNA 型トランスポゾンをもとに作製した遺伝子導入用ベクターによりカイコを形質転換させることが可能である。特に piggyBac をもとに作製した遺伝子導入用プラスミドベクターは、カイコ卵に微量  
5 注入することにより、実際にカイコを形質転換させることに成功している (Nat. Biotechnol. 18, 81-84, 2000)。

例えば piggyBac の性質を利用して、以下の方法により遺伝子組換えカイコを作  
出することができる。まず、カイコ・ゲノム配列内にクモ糸タンパク質を含む絹  
糸を産生するようにデザインされた遺伝子を挿入する。このためには、田村らの  
10 方法 (Nat. Biotechnol. 18, 81-84, 2000) と同様な方法によって行うことがで  
きる。即ち、piggyBac の一対の逆向き反復配列を適当なプラスミドベクターに組  
み込み、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を  
一対の逆向き反復配列で挟むように挿入する。そしてこの遺伝子導入用プラスミ  
ドベクターを、piggyBac のトランスポゼース発現ベクター (ヘルパープラスミ  
15 ド) と共にカイコ卵へ微量注入する。このヘルパープラスミドは、piggyBac の逆  
向き反復配列の片方または両方を欠いた、実質的には piggyBac のトランスポゼ  
ース遺伝子領域のみが組み込まれている組換えプラスミドベクターである。この  
ヘルパープラスミドにおいて、トランスポゼースを発現させるためのプロモーター  
は、内在性のトランスポゼースプロモーターをそのまま利用しても良いし、ある  
20 いは、カイコ・アクチンプロモーターやショウジョウバエ HSP70 プロモーター等  
を利用してよい。次世代カイコのスクリーニングを容易にするために、クモ糸  
タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を付加したクモ糸  
タンパク質発現ベクター内に同時にマーカー遺伝子を組み込んでおくこともでき  
る。この場合、マーカー遺伝子の上流に例えばカイコ・アクチンプロモーターや  
25 ショウジョウバエ HSP70 プロモーター等のプロモーター配列を組み込み、その作  
用によりマーカー遺伝子が発現させるようにする。

クモ糸タンパク質発現ベクターを微量注入したカイコ卵から、孵化した幼虫 (G  
0 世代) を飼育する。この G0 世代のカイコのうち一部カイコには、クモ糸タンパ

ク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれている。しかし、この世代のカイコでは、カイコ体内の全細胞のうちの一部の細胞にのみクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれており、全細胞にクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれたカイコを得るためには、G0 カイコを交配し、生殖細胞を通じて、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が伝達された遺伝子組換えカイコを得なければならない。即ち、得られた全 G0 世代のカイコを非組換えカイコと、あるいは G0 カイコ同士で交配し、次世代 (G1 世代) のカイコからクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を有した遺伝子組換えカイコを選抜する必要がある。G1 世代のカイコからの遺伝子組換えカイコを選抜は、例えば PCR 法やサザンブロット法を用いて行う。また、マーカー遺伝子を組み込んだ場合には、その表現形質を利用して選抜することも可能である。例えばマーカー遺伝子として GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子を利用した場合には、G1 世代のカイコ卵や幼虫に励起光を照射し、蛍光タンパク質の発する蛍光を検出することにより行うことができる。

このようにして選抜されたカイコは、その染色体内にクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が組み込まれている遺伝子組換えカイコである。加えて、こうして得られた遺伝子組換えカイコは、W002/40528A1 (特許文献 3) に記載された相同組換えによって得られた遺伝子組換えカイコと異なり、正常なカイコフィブロイン H 鎖遺伝子が残されたままであり、つまり、一対のフィブロイン H 鎖遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコである。

本発明において、絹糸に含まれるクモ糸タンパク質の含量は特に制限されるものではなく、重量比で 0.1%~30%の範囲であればよい。このとき、カイコの吐糸行動による繊維化を妨げない範囲であることが望ましい。しかし 30%以上の含量であることにより、強度が低下してしまう可能性がある。そこで強度および／または伸度を保ち、かつクモ糸の持つ所望の性質を付与するためには、より好ましくは 0.1~25%、より好ましくは 1~15%、さらに好ましくは 1~10%の範囲で含まれることが望ましい。

クモ糸タンパク質を重量比 0.1% から 25% の範囲内で含む絹糸は、たとえば、フィブロイン H 鎖上流プロモーター・フィブロイン H 鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン領域・第二エキソン領域の一部 (GeneBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 57444~63513 番目) の下流、またはフィブロイン H 鎖プロモーター・フィ  
5 ブロイン H 鎖遺伝子第一エキソン・第一イントロン・第二エキソン領域 (GeneBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 62118~63513 番目) の下流に、配列番号 1 で示されるペプチドを複数回繰り返したペプチド配列をコードした塩基を連結し、さらにその下流にフィブロイン H 鎖 C 末端領域遺伝子・フィブロイン H 鎖ポリ A シグナル領域 (GeneBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 79099~79995 番目) を、フ  
10 レームが合うように連結した遺伝子構造を、XhoI 処理後平滑化した pigA3GFP プラスミドに連結する。この遺伝子導入用ベクターおよびピギーバックトランスポゼースタンパク質を生産する DNA を含むヘルパープラスミド (pHA3PIG) を各 200  $\mu$ g/ml 含んだ 0.5mM リン酸バッファー (pH7.0)・5mMKCl 溶液を調製し、3~20nl を産卵後 4 時間以内のカイコ卵に対してマイクロインジェクションし、遺伝子組  
15 換えカイコを作る。このように作成した組換えカイコは、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生する。

このとき、遺伝子の導入された染色体上の位置の違いにより、含まれるクモ糸タンパク質の含量には差異が生じる。

さらに、導入するクモ糸タンパク質のペプチド配列の繰り返しの回数に特に制限はないが、好ましくは 3~30 回、さらに好ましくは 4~16 回である。

クモ糸タンパク質の含量は、繭を可溶化後、SDS-PAGE に付し、銀染色キット (第一化学薬品株式会社製) を用い、添付のプロトコールに従ってクモ糸タンパク質の検出を行い、その結果をモレキュラーイメージャー (BioRad 社製) を用いてシグナル強度を測定し、濃度既知のタンパク質例えばネコインターフェロンのシ  
25 グナル強度と比較することでタンパク質含量を測定することができる。

本発明において使用される DNA を取得する方法に特に制限はない。既知の遺伝子情報に基づき、PCR 法を用いて必要な遺伝子領域を増幅取得する方法、既知の遺伝子情報に基づきゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーより相同性を指標

としてスクリーニングする方法などが挙げられる。本発明においては、これらの遺伝子は遺伝的多型性や変異剤などを用いた人為的変異処理による変異型も含む。遺伝的多型性とは遺伝子上の自然突然変異により遺伝子の塩基配列が一部変化しているものをいう。

- 5      クモ糸タンパク質を絹糸腺細胞の外に大量に分泌させる場合、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分をクモ糸タンパク質と融合させることにより、絹糸中にクモ糸タンパク質を産生することが可能となる。また、フィブロインH鎖遺伝子のC末端部分は、クモ糸タンパク質のN末端側、C末端側、クモ糸タンパク質中のいずれに存在してもよい。この部分には、少なくともシステイン残基が一つ存在している。フィブロインH鎖タンパク質においては、フィブロインL鎖とジスルフィド結合で結合する役割を有しているシステイン残基はフィブロインH鎖タンパク質のC末端から20番目に位置することになる。クモ糸タンパク質と融合させるフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分の長さは、フィブロインL鎖とのジスルフィド結合の形成を阻害することがない限り特に制限はない。
- 10
- 15

- 同じくクモ糸タンパク質を絹糸腺細胞の外に大量に分泌させる場合、フィブロインH鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインL鎖タンパク質と融合させることで、絹糸中にクモ糸タンパク質を産生することも可能である。しかし、高伸度、高強度といった所望の性質をクモ糸タンパク質を含む絹糸に付与するためには、フィブロインH鎖タンパク質のC末端部分を融合させる方が好ましい。
- 20

- 本発明における「フィブロインH鎖タンパク質に含まれるポリペプチド」とは、フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分のポリペプチドおよび／またはフィブロインH鎖遺伝子の第1エキソンと第2エキソンの一部にコードされるポリペプチドを示す。フィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含むフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分のポリペプチドとして、好ましくは配列番号3に記載のポリペプチドが用いられる。また、フィブロ
- 25



インH鎖遺伝子の第1エキソンと第2エキソンの一部にコードされるポリペプチドとして、好ましくは配列番号4に記載のポリペプチドが用いられる。このとき、実質的に同等の機能を有する範囲において、1またはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加を有するものも用いることができる。

- 5       ポリA付加領域についても特に制限はないが、フィブロインH鎖、フィブロインL鎖、セリシンなど絹糸腺で大量に発現しているタンパク質遺伝子のポリA付加領域が好適に使用できる。

- 本発明における遺伝子組換えカイコとは、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子構造を有するカイコを示す。組換え体の選抜を  
10       容易にする目的で、抗生物質耐性遺伝子、クラゲ由来蛍光緑色タンパク質遺伝子などマーカー遺伝子を組み込んでおくこともできる。

      本発明におけるクラゲ由来緑色蛍光タンパク質（GFP）とは、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質を示し、励起光により緑色の蛍光を発することが特徴である。蛍光強度や蛍光波長が改良された類縁体を用いることも可能である。

- 15       しかし、クモ糸タンパク質のもつ高強度、高伸度といった特徴を発揮するには、こうした選択マーカーとなるタンパク質をコードする遺伝子と、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子とをフレームが一続きとなるように連結し、選択マーカーとなるタンパク質との融合タンパク質として発現させることは好ましくない。結晶性の高い繊維タンパク質としての性質を持つクモ糸タンパク質に、結晶性が低  
20       く、非繊維性のGFPを融合させることは、絹糸の結晶化を阻害し、繭の重量低下、絹糸の強度低下を引き起こす可能性があるからである。従って、「クモ糸タンパク質が、選択マーカーとなるタンパク質と融合していない」ことは、W002/40528A1（特許文献3）において開示されている実施例と異なり、強度、伸度および／あ  
25       るいはタフネスを低下させないために重要な現象である。W002/40528A1（特許文献3）に記載の手法では、GFPなどの選択マーカーとなるタンパク質と融合させることが実質的に必須であるが、本発明においては選択マーカーとなるタンパク質を融合させる必要はない。

      本発明における「一对のフィブロインH鎖遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコ」

とは、内在性のカイコフィブロインH鎖遺伝子に、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子やGFPなどの蛍光タンパク質遺伝子といった外来遺伝子が挿入されておらず、正常なフィブロインH鎖遺伝子を持っており、かつフィブロインH鎖遺伝子以外の領域に、カイコが本来有していない外来遺伝子が導入されている遺伝子組換えカイコを示す。好ましくは、相同染色体上の同一遺伝子座に存在する一対のフィブロインH鎖遺伝子をもつ遺伝子組換えカイコを示す。

一対のフィブロインH鎖遺伝子以外に外来遺伝子が導入されたことを確認するには、まず、遺伝子組換えカイコゲノムから外来遺伝子が挿入された断片を、インバースPCRや、カイコゲノムを種々の制限酵素で処理し外来遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法を用い、常法によるクローニングを行うといった手法により取得する。こうして得られた断片の塩基配列を確認することで、フィブロインH鎖遺伝子（GeneBank登録番号AF226688の塩基番号57444～7995）以外に外来遺伝子が導入されたことを確認することができる。

カイコの絹糸は主としてフィブロインH鎖タンパク質が繊維化することにより形成される。したがって、一対のフィブロインH鎖遺伝子を有することは、遺伝子組換えカイコの作る絹糸において、強度や伸度といった物性を低下させない上で重要な現象である。

本発明において、フィブロインH鎖タンパク質の構造を基本的に保持することとは、フィブロインH鎖タンパク質を主要な構成成分とするフィブロイン層の構造が、非遺伝子組換えカイコの吐糸する絹糸のフィブロイン層と同様の形態であることを示し、光学もしくは電子顕微鏡観察により確認することができる。フィブロインH鎖タンパク質の構造が本質的に保持されることも、遺伝子組換えカイコの作る絹糸において、強度や伸度といった物性を低下させない上で重要な現象である。

これらのカイコを非組換えカイコまたは遺伝子組換えカイコどうしで交配させた場合、子孫においてもクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子は消失することなく伝達され、世代を通じてクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生させることができる。

従って、組換えカイコを継代し頭数を増やすことで、クモ糸タンパク質を含む絹糸の生産量を容易にスケールアップすることが可能である。交配において、商業用蚕品種のカイコと交配させることで、クモ糸タンパク質を含む絹糸の産生量を向上させることも可能である。この場合、目的のクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子が導入されたカイコを適宜選抜しながら継代していく必要が生じる。この場合、任意の組織から得られた細胞の DNA を用いて、組換えカイコ選抜に使用したマーカー遺伝子やクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子の存在や構造を、PCR、サザンブロットティング法などで解析することで、容易に組換えカイコの遺伝子を継承した子孫を判別することが可能である。また、GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子を利用した場合には、カイコ卵や幼虫に励起光を照射し、蛍光タンパク質の発する蛍光を検出することにより選抜を行うことができる。

カイコガ (*Bombyx mori*) の卵に含まれる細胞に遺伝子を導入する場合には、マイクロインジェクションする方法が好適である。ここで卵にマイクロインジェクションを行う場合、卵中の細胞に直接マイクロインジェクションする必要はなく、卵中にマイクロインジェクションするだけで遺伝子を導入することが可能である。

本発明における「遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、強度が向上している」とは、クモ糸の持つ所望の性質である高強度性が反映されたことを示す。具体的には絹糸に加重を加え、破断するまでの破断強度が向上したことを示す。

強度の測定には引張り試験機 (テンシロン) を用いて測定することができる。破断強度は、破断点までの最大点荷度 (g) / 織度 (d) として表される。織度の測定は単位長さにおける重量から算出することができる。遺伝子を組換えたカイコが作る繭から得られた絹糸と、遺伝子を組換えていない同種カイコが作る繭から得られた絹糸との強度を比較することで向上したか否かを判定することができる。好ましくは遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、強度が 1 % 以上向上していることが望ましい。より好ましくは強度が 10 % 以上向上し、さらに好ましくは 20 % 以上向上していることが望ましい。

本発明における「遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、伸度が向上している」とはクモ糸の持つ所望の性質である高伸度性が反映されたことを示す。具体的には絹糸に加重を加え、破断するまでの破断伸度が向上したことを示す。伸度の測定には引張り試験機（テンシロン）を用いて測定

5 することができる。遺伝子を組換えたカイコが作る繭から得られた絹糸と、遺伝子を組換えていない同種カイコが作る繭から得られた絹糸との破断伸度を比較することで向上したか否かを判定することができる。好ましくは遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、伸度が１％以上向上していることが望ましい。より好ましくは伸度が１０％以上向上し、さらに好ましくは伸度

10 度が３０％以上向上していることが望ましい。

強度×（伸度）<sup>1/2</sup>として算出されるタフネスを、遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較した場合、好ましくは遺伝子を組換えていない同種カイコにより作られる絹糸と比較して、タフネスが１％以上向上していることが望ましい。より好ましくはタフネスが１０％以上向上し、さらに好ましくは

15 タフネスが４０％以上向上していることが望ましい。

本発明において「クモ糸タンパク質を含む絹糸を用いた織物」とは、クモ糸タンパク質がたて糸および／または横糸に用いられた織物を表す。クモ糸タンパク質を含む絹糸のみから構成される織物であっても良く、非組換えカイコの絹糸との混紡糸が用いられても良く、絹糸ではない繊維との混紡糸が用いられても良く、

20 加工され表面処理剤として用いられても良く、加工され不織布として用いられても良い。また、編み物であるニットに用いられても良い。織物の作製方法として、特に制限されるものではないが、具体的には平織り、綾織り、朱子織り、からみ織りなどが挙げられる。

絹糸中でのクモ糸タンパク質の存在形態としては、分散と局在が予測される。

25 局在とはフィブリン層において、組換えタンパク質が一部分に集合して存在していることをしめす。局在している場合、酢酸ウラニルと鉛の二重染色による電子顕微鏡観察において、染色性の異なる領域として観察される。もしくは、絹糸をグルタルアルデヒドで固定、エポキシ樹脂で包埋し作成した切片箔に対し、組

換えタンパク質に対する抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行うことで、組換えタンパク質由来のシグナルが、フィブロイン層中で偏っていることで判定できる。組換えタンパク質が絹糸中に分散している場合、同じく免疫電子顕微鏡観察でフィブロイン層中での組換えタンパク質由来のシグナルが偏ることなく存在していることを示す。

クモ糸タンパク質が絹糸中に分散していることを特徴とする本発明における絹糸は、絹糸を構成するフィブロインタンパク質と、クモ糸タンパク質との複数のタンパク質（ポリマー）からなるアロイである。一般に２種類のポリマーをブレンドしても、両者の性質の違いにより分離し、諸物性が低下する。絹糸において、絹糸を構成するフィブロインタンパク質と、フィブロイン以外の組換えタンパク質を混合して、人工的に繊維化させる場合、両者の結晶性の違いによりフィブロインタンパク質と組換えタンパク質は均一に混合されず、強伸度といった諸物性は低下する。本発明において示した手法により、絹糸を構成するフィブロインタンパク質と、フィブロイン以外の組換えタンパク質を均一に混合させることができ、組換えタンパク質が絹糸中に分散していることを特徴とする組換えタンパク質を含む絹糸を得ることができる。該絹糸はフィブロインのもつ強伸度を低下させることなく、組換えタンパク質の持つ所望の性質を該絹糸に付与することが可能となる。

以下に実施例を示し、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例の記載に限定されるものではない。

## 実施例

### 〔実施例１〕 カイコガ (*Bombyx mori*) のゲノム DNA の調製

５齢３日目のカイコを解剖し、後部絹糸腺組織を取り出した。１×SSC で洗浄した後、DNA 抽出バッファー (50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 100mM NaCl) 200  $\mu$ l を加えた。Proteinase K (final 200  $\mu$ g/ml) を加えて組織をグライNDER で充分すりつぶし、更に DNA 抽出バッファーを 350  $\mu$ l、10%SDS 60  $\mu$ l を加えて混合した。50°C ２時間保温した。Tris-HCl 飽和フェノール (pH8.0) 500  $\mu$ l を加え

10 分混合後、10,000rpm 5 分 4℃にて遠心分離し上清を回収した。上清をフェノール／クロロホルム処理し、ゲノム DNA をエタノール沈殿した。RNase 入り滅菌水で 100  $\mu$ g/ml となるように溶解、希釈しゲノム DNA 溶液を調製した。

〔実施例 2〕 遺伝子の調製

- 5 用いた遺伝子は既知の配列を利用して、その両端配列のプライマーを作製し、適当な DNA ソースを鋳型として PCR を行うことにより取得した。プライマーの端には後の遺伝子操作のために制限酵素切断部位を付加した。

フィブロイン H 鎖プロモーター・フィブロイン H 鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域 (GeneBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 62118～  
10 63513 番目：以下 HP 領域) は、カイコガのゲノム DNA を鋳型に、プライマー 5 (配列番号 5) とプライマー 6 (配列番号 6) の 2 種類のプライマーを用いた PCR により取得した。

フィブロイン H 鎖上流プロモーター・フィブロイン H 鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン領域 (GeneBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 57444～62927 番  
15 目：以下 HUP 領域) は、カイコガのゲノム DNA を鋳型に、プライマー 7 (配列番号 7) とプライマー 8 (配列番号 8) の 2 種類のプライマーを用いた PCR により取得した。

フィブロイン H 鎖 C 末端領域遺伝子・フィブロイン H 鎖ポリ A シグナル領域 (GeneBank 登録番号 AF226688 の塩基番号 79099～79995 番目：以下 HC 領域) は、カイコガのゲノム DNA を鋳型に、プライマー 9 (配列番号 9) とプライマー 10 (配列番号 10) の 2 種類のプライマーを用いた PCR により取得した。

PCR は KODplus (東洋紡 (株) 製) を用いて添付のプロトコールに従って行った。すなわち、カイコガのゲノム DNA を鋳型とする場合にはこれを 100ng 加え、各プライマーを 50pmol、添付の 10×PCR バッファーを 10  $\mu$ l、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTPs、2 単位 KODplus となるように各試薬を加え、全量 100  $\mu$ l とする。DNA の変性条件を 94℃、15 秒、プライマーのアニーリング条件を 55℃、30 秒、伸長条件を 68℃、60 秒～300 秒の条件で Perkin-Elmer 社の DNA サーマルサイクラーを用い、30 サイクル反応させた。

これらの反応液を 1%アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれ HP 領域では約 1.4kbp.、HUP 領域では約 5.5kbp.、HC 領域では約 0.8bp の DNA 断片を常法に従って抽出、調製した。これらの DNA 断片をポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造（株）製）によりリン酸化した後、BamHI で切断後、T4DNApolymerase を用い定法により平滑化し、さらに脱リン酸化処理した pUC19 ベクターに宝酒造（株）の DNA Ligation Kit Ver.2 を用いて 16℃、終夜反応を行い、連結した。これらを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体に PCR 断片が挿入されていることを、得られたコロニーを前述と同じ条件で PCR することによって確認し、PCR 断片の挿入されたプラスミドを常法によって調製した。これらのプラスミドをシーケンスすることにより、得られた断片がそれぞれの遺伝子の塩基配列であることを確認した。

クモ糸遺伝子の取得は、ATCC から以下の株として入手可能である。大腸菌 (*E. coli*) FP3227 69326 1993 年 6 月 15 日、*E. coli* FP 2193 69327 1993 年 6 月 15 日、*E. coli* FP 3350 69328 1993 年 6 月 15 日。

または、Reviews in Molecular Biology 74(2000) 105-109 や Appl. Microbiol. Biotechnol. 47(1997) 23-39 に開示されている手法により、人工合成したオリゴヌクレオチドを元に作成することが可能である。すなわち人工合成したオリゴヌクレオチドの両端に、BglII と BamHI の制限酵素認識部位を、同じフレームになるようデザインし、両者を順次連結することで種々のサイズのクモ糸遺伝子を作製することが可能である。本実施例では配列番号 1 記載の DP-1B.33 ポリペプチドを 4 回繰り返した DP4、DP-1B.33 を 8 回繰り返した DP8、DP-1B.33 を 12 回繰り返した DP12、DP-1B.33 を 16 回繰り返した DP16 遺伝子断片を作製した。

同様の手法により、配列番号 2 に記載のポリペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを作製し、これを連結することで配列番号 2 記載のポリペプチドが 8 回繰り返したタンパク質をコードするプラスミドを構築し、これを BglII と BamHI で切断し、AEX 遺伝子断片を作製した。

#### 〔実施例 3〕 遺伝子導入用プラスミドの作製

遺伝子導入用プラスミドには pigA3GFP (Nature Biotechnology 18, 81-84, 200

0) を利用した。すなわち、米国特許第 6218185 号に開示されるプラスミド p3E1. 2 より transposase をコードする領域を取り除き、その部分に A 3 プロモーター (GenBank 登録番号 U49854 の塩基番号 1764~2595 番目) および pEGFP-N1 ベクター (Clontech 社製) 由来の G F P および SV40 由来ポリ A 付加配列 (GenBank 登録番号 U55762 の塩基番号 659~2578 番目) を挿入したベクターが pigA3GFP であり、このベクターは独立行政法人農業生物資源研究所から分与可能である。その A 3 プロモーターの上流側にある Xho I 部位を平滑化シクモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子を挿入した。

本実施例における、クモ糸タンパク質を含む絹糸を産生するようにデザインされた遺伝子の構成は、HP・DP16, 12, 8, 4・HC および HP・AEX・HC、さらには HUP・DP8, 4・HC である。

以下に具体的な方法を示す。

図 1 には、HP・DP16, 12, 8, 4・HC および HP・AEX・HC の作製ストラテジーを示した。実施例 2 にて調製した HP 領域を持つプラスミドと HC 領域を持つプラスミドを BamHI と SalI で処理し、それぞれ約 1.4kbp 断片と 3.6kbp 断片を連結した。これを BamHI で処理後、脱リン酸化したプラスミドと、実施例 2 で取得した両端が BglIII および BamHI 付着末端を持つ DP16 断片、DP12 断片、DP8 断片、DP4 断片 および AEX 断片を連結した。連結部の塩基配列を確認し、連結部が同一フレームでの読み枠であること、順向きであることを確認した。各プラスミドを AscI で処理し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子を含む DNA 断片を、XhoI 処理後平滑化した pigA3GFP プラスミドに連結し、各種遺伝子構造 HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC をもった各種遺伝子導入ベクターを作製した。

図 2 には HUP・DP8, 4・HC の作製ストラテジーを示した。実施例 2 にて調製した HUP 領域を持つプラスミドを SphI と XhoI で処理し、約 5.5kbp 断片を得た。これを、図 2 に示したように、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC 作製の過程で得られたプラスミドを SphI と XhoI で処理し得られた断片と連結した。連結部の塩基配列を確認し、塩基の欠失、挿入が起きていないことを確認した。各プラスミドを AscI で



処理し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子を含む DNA 断片を、XhoI 処理後平滑化した pigA3GFP プラスミドに連結し、各種遺伝子構造 HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC を持った各種遺伝子導入ベクターを作製した。

【実施例 4】 遺伝子組換えカイコの作製

- 5 実施例 3 に記載の遺伝子導入用ベクターとピギーバックトランスポゼースタンパク質を生産するヘルパープラスミド DNA (pHA3PIG) (Nature biotechnology 18, 81-84, 2000 農業生物資源研究所より分与可能) を、各 200  $\mu$ g/ml 含んだ 0.5mM リン酸バッファー(pH7.0)・5mMKCl 溶液に調製し、3~20nl を産卵後 4 時間以内の
- 10 カイコ卵 500 個に対してマイクロインジェクションした。pHA3PIG は、ピギーバックトランスポゾンの方の逆位反復配列と 5' フランキング領域、トランスポゼース遺伝子のリーダー配列を欠いており、その代わりにカイコアクチン遺伝子の 5' フランキング領域とリーダー配列が組み込まれている。pHA3PIG はアクチン
- 15 プロモーターの働きによりピギーバックトランスポゼースタンパク質を作る機能を持つが、ピギーバックトランスポゾンの方の逆位反復配列が欠損しているため自身の DNA は転移しない。そのカイコ卵より孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫 (G0) を群内で掛け合わせ得られた次世代 (G1) をクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) の蛍光を観察することにより、クラゲ緑色蛍光タンパク質遺伝子が
- 20 染色体へ導入されたカイコをスクリーニングした。その結果、クラゲ緑色蛍光タンパク質の働きにより蛍光を発する遺伝子組換えカイコが得られた。遺伝子組換体の選抜は、内部交配により得られた G1 幼虫での GFP の蛍光を指標にスクリーニングした。後部絹糸腺組織におけるアクチンプロモーター制御化での遺伝子発現はきわめて低く、また、絹糸腺組織から絹糸中に分泌される上で重要なフィブロ
- 25 インリン鎖タンパク質との結合を形成することはない。つまり、本発明においては、クモ糸タンパク質を含む絹糸には、GFP は含まれず、本発明において、遺伝子組換えカイコの選抜には、繭および絹糸での GFP による蛍光を指標として用いない。遺伝子組換えカイコの作製結果を表 1 に示す。

【表 1】

表1 遺伝子組換えカイコの作製結果

遺伝子構造	インジェクション卵数	孵化卵数	総 G1 数	GFP ポジティブ G1 数	形質転換効率%
HP・DP16・HC	500	80	32	3	4.7
HP・DP12・HC	1056	169	51	8	7.8
HP・DP8・HC	500	202	93	14	7.1
HP・DP4・HC	500	171	81	13	8.2
HP・AEX・HC	500	211	96	15	7.8
HUP・DP8・HC	1824	544	170	4	1.2
HUP・DP4・HC	1152	414	139	7	2.5

〔実施例5〕 サザンハイブリダイゼーションによるクモ糸タンパク質遺伝子導入の確認

HP・DP8・HC、HP・DP4・HC 遺伝子を導入した G1 カイコのうち、GFP の蛍光を示すカイコをランダムに選抜し、実施例1に記載の方法でゲノム DNA を調製し、EcoRI で制限酵素処理を行い、電気泳動後メンブレンにブロットした。プローブはアマシャムファルマシア社製 Gene-Image™ Random prime labelling and detection module をもちいて、DP8/BglIII, BamHI 断片をラベリングし用いた。添付のプロトコルに従いクモ糸タンパク質をコードする遺伝子の検出を行った。その結果を図3に示す。調べた全ての GFP 蛍光を示すカイコにおいて、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子が検出された（矢印で示す）。また、シグナルのサイズが異なることから、染色体上にランダムに挿入されたと考えられる。

〔実施例6〕 遺伝子組換えカイコの作製する繭の解析

次に絹糸に含まれるクモ糸タンパク質の検出、含量の測定を行った。

15 遺伝子を組換えていないカイコ (WT) および遺伝子組換えカイコ (HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC 遺伝子を導入したカイコ) の繭を各 10mg 量り採り、60%LiSCN4ml を加え攪拌後、終夜室温に静置し繭を溶解した。これを 8M 尿素・2%SDS・5%2-メルカプトエタノールで 10 倍希釈したものをサンプルとし、SDS-PAGE に付した後、銀染色  
20 キット（第一化学薬品株式会社製）を用い、添付のプロトコルに従ってクモ糸タンパク質の検出を行った。その結果をモレキュラーイメージャー (BioRad 社製)

を用いてシグナル強度を測定し、濃度既知のタンパク質としてはネコインターフェロンを用いてそのシグナル強度と比較しタンパク質含量を測定した。シグナルの比較には、BioRad 社製モレキュラーイメージャーFXPro を用いた。

さらに、ECL Plus™ Western blotting Kit (アマシャムファルマシア社製) を  
5 用い、添付のプロトコールに従ってクモ糸タンパク質の検出を行った。DP の検出には配列番号 1 1 に示した CGAGQGGYGGLGSQAGRG ペプチドに対する十分な抗体価を有する特異的なペプチド抗体を、AEX の検出には配列番号 1 2 に示した CGPGQQGPGYGPQQGPS ペプチドに対する十分な抗体価を有する特異的なペプチド抗体を、共にラビットを用いて作製し、これらの抗体を用いて添付のプロトコールに従って検  
10 出した。すなわち、ブロッティングしたメンブレンをブロッキング溶液 (5%スキムミルク・0.1%Tween20・PBS) 中で 4℃終夜ブロッキングした。メンブレンを TPBS (0.1%Tween20・PBS) で 2 回洗浄し、TPBS で 1000 倍希釈した抗クモ糸タンパク質抗体で室温 1 時間処理した。メンブレンを TPBS で 2 回洗浄し、更に TPBS で 5 分間 3 回洗浄した。その後 TPBS で 10000 倍希釈した後、HRP ラベル抗ラビット IgG  
15 抗体で室温 1 時間処理した。メンブレンを TPBS で 2 回洗浄し、更に TPBS で 5 分間 3 回洗浄した後、ECL Plus™ Western blotting Detection System (アマシャムファルマシア社製) の検出試薬 (溶液 A+溶液 B) を加えた。発光を Hyperfilm™ ECL™ に露光、現像した。HP・DP16・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC 遺伝子構造を導入したカイコの作る繭を分析した結果を図 4 に示す。クモ糸タンパク質の分子量は、遺伝子構造から予測される分子量と一致していた。また、クモ糸タンパク質の占める割合は、重量比で約 0.1%~15%であった。さらに、フィブロイン L 鎖タンパク質の分子量相当のサイズが増加した、フィブロイン L 鎖タンパク質とジスルフィド結合した状態のシグナル (星印で示す) が検出された。HUP 遺伝子構造を持つもの (HUP・DP8・HC、HUP・D  
20 P4・HC) は、HP 遺伝子構造を持つもの (HP・DP8・HC、HP・DP4・HC) と比較して、クモ糸タンパク質の含量が増大していた。絹糸に GFP が含まれているかを、GFP に対する抗体 (コスモバイオ社製) をもちいたウエスタン解析により判定したが、GFP は検出されなかった。

- HP・DP16・HC、HP・DP12・HC、HP・DP8・HC、HP・DP4・HC、HP・AEX・HC、HUP・DP8・HC、HUP・DP4・HC 遺伝子構造を導入したカイコの作る繭（繭糸＋蛹）の平均重量を雄 10 粒雌 10 粒用い測定、比較した。さらに、クモ糸タンパク質の含量（重量％）を測定した。これらの結果を表 2 に示す。HP・AEX・HC を除き、繭重量に大きな変化は見られなかった。これは DP クモ糸タンパク質がカイコフィブロインの繊維化を阻害しなかったことを示す。これは、遺伝子の導入を、相同組換えではなくトランスポゾンにより行うことで、カイコフィブロイン H 鎖遺伝子に変異が起きなかった結果であると考えられる。

【表 2】

表 2

遺伝子構造	平均重量 mg	クモ糸タンパク質含量%
非組換え	100	0
HP・DP16・HC	94	0.5
HP・DP12・HC	104	2
HP・DP8・HC	104	0.5～5
HP・DP4・HC	102	1～3
HUP・DP8・HC	77	4～18
HUP・DP4・HC	85	5～15
HP・AEX・HC	34	0.5～1

#### 【実施例 7】 絹糸の調製

コントロールとして非遺伝子組換えカイコの作る繭、サンプルとして HP・DP8・HC 遺伝子構造を導入したカイコの作る繭を、重量が 40％になるまで 80℃にて乾燥させた。3%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中で 95℃ 2 分、次いで 60℃ 3 分、次いで 95℃ 3 分煮繭した。40℃の温水で洗浄した後、座繰り操糸器（斉藤機料）を用い、常時 40 粒の繭から操糸した。非組換えカイコの絹糸は約 1100m、組換えカイコ（HP・DP8・HC）の絹糸は約 1200m 得られた。

得られた絹糸を、0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中で 60℃に加温し、次いで 1%マルセル石鹼水溶液中で 1 時間煮沸し、0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液で洗浄後、水洗して絹糸の

精練を行った。60℃にて乾燥し、精練された非組換え絹糸と精練された HP・DP8・HC 絹糸を得た。精練前の絹糸と、精練後の絹糸の走査電子顕微鏡写真を図 5 (1500倍) に示した。表面のセリシン除去が認められる。また、精練前後の重量を比較した結果、非組換え絹糸と HP・DP8・HC 絹糸共に、減練率が 16% であり、セリシンは除去されたと考えられる。

#### 【実施例 8】 絹糸の物性の測定

物性の測定に、クモ糸タンパク質を含む絹糸として、実施例 7 に記載の手法により調製した HP・DP8・HC 遺伝子構造を導入したカイコの作る絹糸 (HP・DP8・HC) と、非組換えカイコの絹糸を用い、それぞれの精練前、および精練後において、物性を測定した。ここで、絹糸中に含まれるクモ糸タンパク質の含量は、HP・DP8・HC では 5%、非組換え絹糸では 0% である。

織度の測定は 90mあたりの重量をもとに算出した。機械物性の測定は引張試験機 (テンシロン) をもちい、つかみ間隔 20cm、引っ張り速度 20cm/分、各 10 検体の平均から算出した。物性の比較を表 3 に示す。

【表 3】

表 3

	非組換え 絹糸 (精練前)	HP・DP8・HC 絹糸 (精練前)	非組換え 絹糸 (精練後)	HP・DP8・HC 絹糸 (精練後)
織度 (d)	57.7	87.7	43	56
強度 (g/d)	3.78	3.93	2.59	3.53
伸度 (%)	32.6	37.8	13.2	19.1
タフネス※	21.5	24.1	9.4	15.4

※タフネスは強度×(伸度)<sup>1/2</sup>として算出

全ての試験項目において、HP・DP8・HC 絹糸は非組換え絹糸と比較して物性が向上していた。特に精練のための加温処理を経ても、強度は 30%以上、伸度は 40%以上、タフネスは 60%以上向上していた。これは精練後も残るフィブロイン層に含まれるクモ糸タンパク質の効果によると考えられる。

#### 【実施例 9】 クモ糸タンパク質を含む絹糸を用いた織物の作製

HP・DP8・HC 絹糸を用いて布を調製した。HP・DP8・HC 絹糸 2 本を 200T/m でか

たよりにし、綾織りにて織物を作製した。

〔実施例 10〕 免疫電子顕微鏡観察

HP・DP8・HC 遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコと、非組換えカイコをつくる繭をサンプルとし、オリゴペプチド CGAGQGGYGGLGSQAGRG に対する十分な抗体価を有する特異的なペプチド抗体 (DP 抗体) を用いて、免疫電子顕微鏡観察を行った。サンプルを 2%グルタルアルデヒド-0.1%カコジル酸緩衝液を用いて室温にて 1 時間固定し、次にエポキシ樹脂 EPON812 を用いて 60℃48 時間重合させ包埋した。ウルトラミクロトームにより超薄切片を調製した。1%BSA/PBS+1.5%ヤギ血清を用い、室温にて 30 分ブロッキングした。一次抗体として 5000 倍希釈した DP 抗体を用いて 4℃一晩抗体処理した。1%BSA/PBS にて室温 10 分 3 回洗浄した。2 次抗体として anti-rabbit IgG Goat-Poly 10nm (British biocell international, LTD 製) を用いて室温にて 1 時間処理した。1%BSA/PBS にて室温 10 分 3 回洗浄した。酢酸ウラニルと鉛の二重染色を室温で各 5 分を行い、電子顕微鏡観察を行った。非組換えカイコをつくる絹糸の縦断面切片を用いた結果を図 6 に示す。絹糸中のフィブロイン層およびセリシン層に、クモ糸タンパク質の存在は確認できない。そして、HP・DP8・HC 遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコをつくる絹糸の縦断面切片を用いた結果を図 7 に示す。HP・DP8・HC 遺伝子を導入した遺伝子組換えカイコをつくる絹糸の縦断面切片を用いた場合において、絹糸中のフィブロイン層に、黒色のドットとしてクモ糸タンパク質が分散して存在していることが確認される。一部に偏って存在している様子は観察されない。

産業上の利用可能性

本件発明によって作られるクモ糸と絹糸のハイブリッドシルクは、高強度、高伸度といったクモ糸タンパク質の性質を保持しているため、航空、宇宙開発、被服製造、牽引ロープ、医療用糸などとして種々の産業において利用することができる。

### 請求の範囲

1. 一対のフィブロインH鎖遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコにより作られることを特徴とするクモ糸タンパク質を含む絹糸。

5 2. 該絹糸が絹糸のフィブロインH鎖タンパク質の基本的な構造を本質的に保持することを特徴とする請求項1に記載のクモ糸タンパク質を含む絹糸。

3. クモ糸タンパク質がフィブロインタンパク質中に分散して存在することを特徴とする請求項1または2に記載の絹糸。

10 4. クモ糸タンパク質がフィブロインH鎖タンパク質に含まれるポリペプチドと融合していることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の絹糸。

5. クモ糸タンパク質が、フィブロインH鎖タンパク質のN末端部分とC末端部分の間に挿入されており、C末端部分に含まれるシステインを介してフィブロインL鎖タンパク質とジスルフィド結合していることを特徴とする請求項4に記載の絹糸。

15 6. クモ糸タンパク質の含量が0.1～2.5重量%である請求項1～5のいずれか1項に記載の絹糸。

7. クモ糸タンパク質の含量が1～1.5重量%である請求項6に記載の絹糸。

20 8. クモ糸タンパク質の含量が1～1.0重量%である請求項7に記載の絹糸。

9. クモ糸タンパク質が、配列番号1のペプチドまたは配列番号1において1もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の絹糸。

25 10. 請求項9に記載のペプチドが3～30回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項9に記載の絹糸。

11. 請求項9に記載のペプチドが4～16回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項10に記載の絹糸。

12. クモ糸タンパク質が、配列番号2のペプチドまたは配列番号2において1もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつクモ糸タンパク質の特性を有するペプチドを含むことを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の絹糸。

5 13. 請求項12に記載のペプチドが3～30回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項12に記載の絹糸。

14. 請求項12に記載のペプチドが4～16回繰り返したクモ糸タンパク質を含むことを特徴とする請求項13に記載の絹糸。

10 15. クモ糸タンパク質が請求項9記載のペプチドおよび請求項12記載のペプチドの両方を含むことを特徴とする請求項1～8のいずれか1項に記載の絹糸。

15 16. クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のC末端部分が配列番号3のペプチドまたは配列番号3において1もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されかつ2または3個のシステインを有するペプチドであることを特徴とする請求項5～15のいずれか1項に記載の絹糸。

20 17. クモ糸タンパク質と融合するフィブロインH鎖タンパク質のN末端部分が配列番号4のペプチドまたは配列番号4において1もしくはそれ以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたペプチドであって、該ペプチドをコードする遺伝子がプロモーターによる外来タンパク質の発現を増強する機能を保持するペプチドであることを特徴とする請求項5～16のいずれか1項に記載の絹糸。

18. クモ糸タンパク質が選択マーカーとなるタンパク質と融合していない請求項1～17のいずれか1項に記載の絹糸。

25 19. 一对のフィブロインH鎖遺伝子を有し、クモ糸タンパク質をコードする遺伝子が一对のフィブロインH鎖遺伝子以外の領域に導入された請求項1～18のいずれか1項に記載の絹糸を作る遺伝子組換えカイコ。

20. 遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーターを有することを特徴とする請求項19に記載の遺伝子組換えカイコ。



21. 遺伝子組換えカイコにおけるクモ糸タンパク質を発現させるため、フィブロインH鎖遺伝子プロモーター及びその上流領域を有することを特徴とする請求項19に記載の遺伝子組換えカイコ。

5 22. フィブロインH鎖プロモーター下流に、フィブロインH鎖遺伝子第一エクソン・第一イントロン・第二エクソン領域の全長またはその一部が連結されていることを特徴とする請求項20または21に記載の遺伝子組換えカイコ。

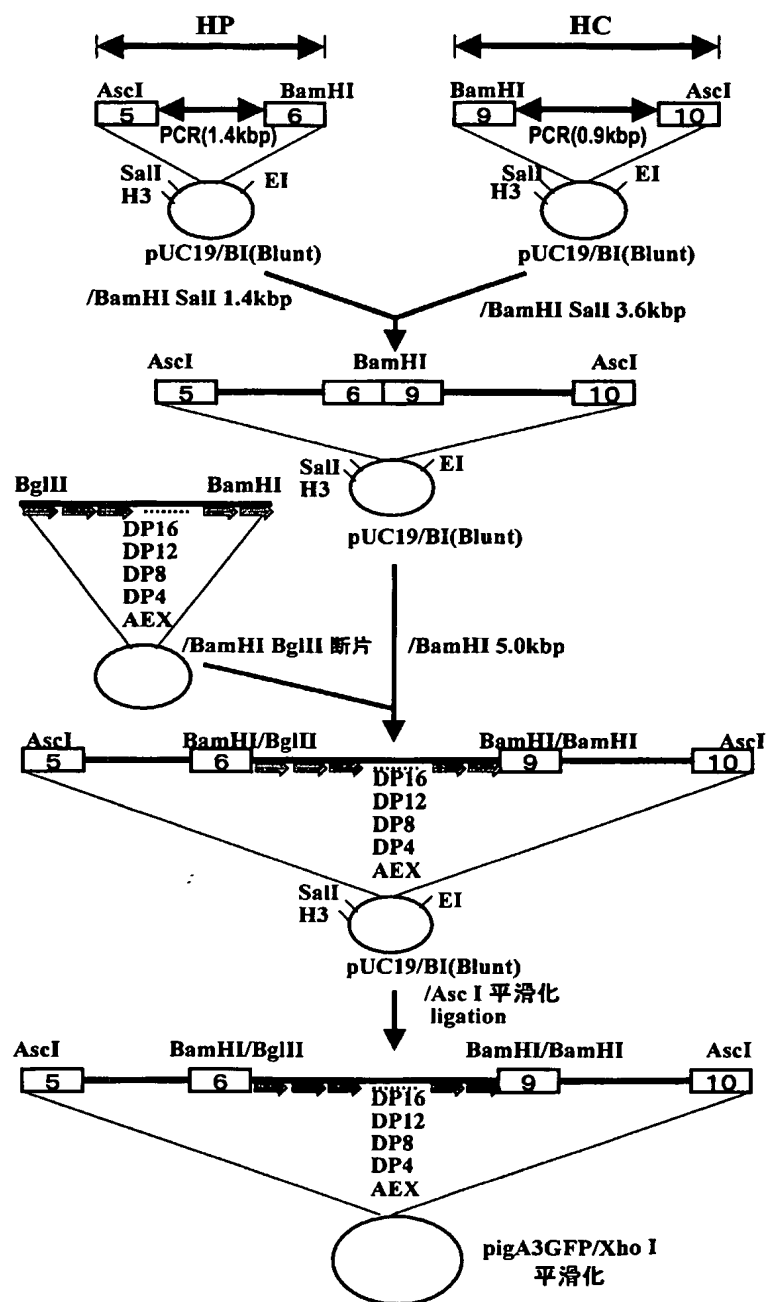
23. トランスポゾンを利用する請求項19～22のいずれかに記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

10 24. トランスポゾンが piggyBac トランスポゾンであることを特徴とする請求項23に記載の遺伝子組換えカイコの製造法。

25. 請求項19～22のいずれか1項記載の遺伝子組換えカイコにより作らせることを特徴とする絹糸の製造方法。

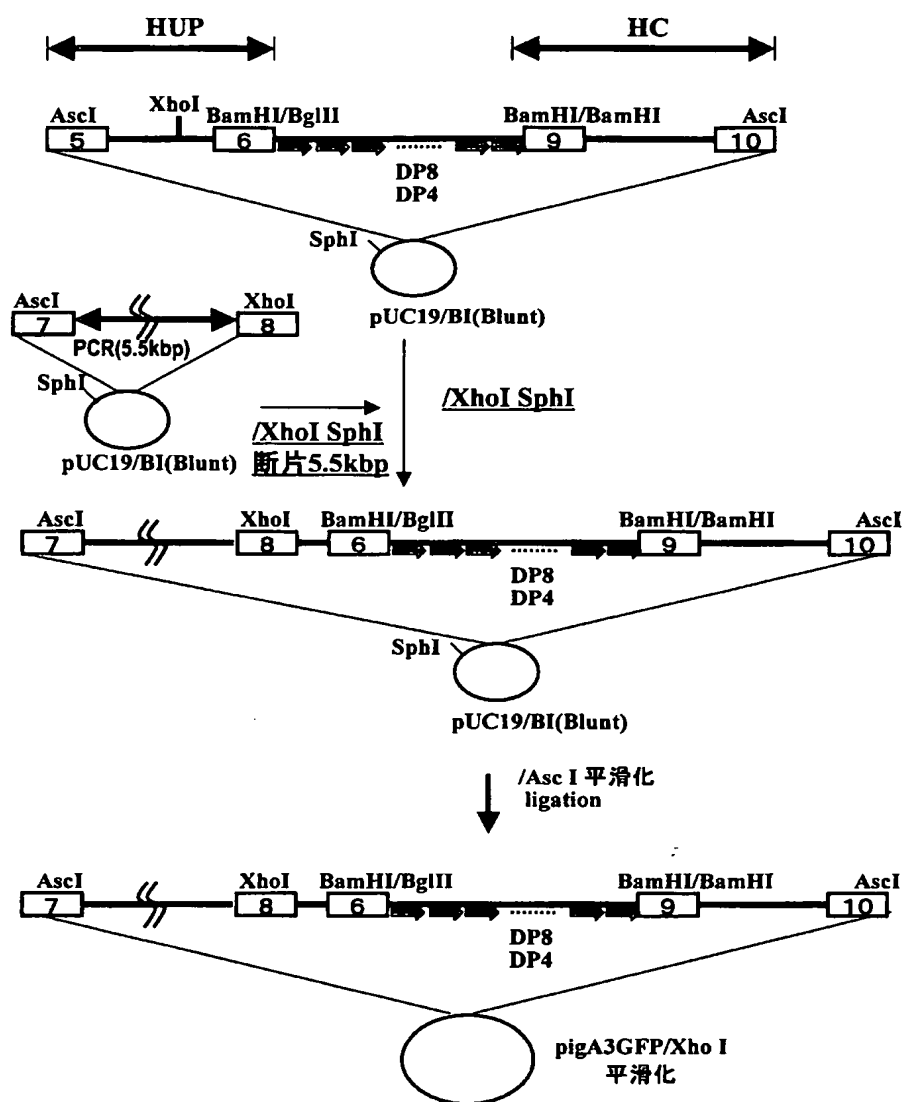
26. 請求項1～18のいずれか1項記載の絹糸を用いた織物。

图 1



2/7

図 2



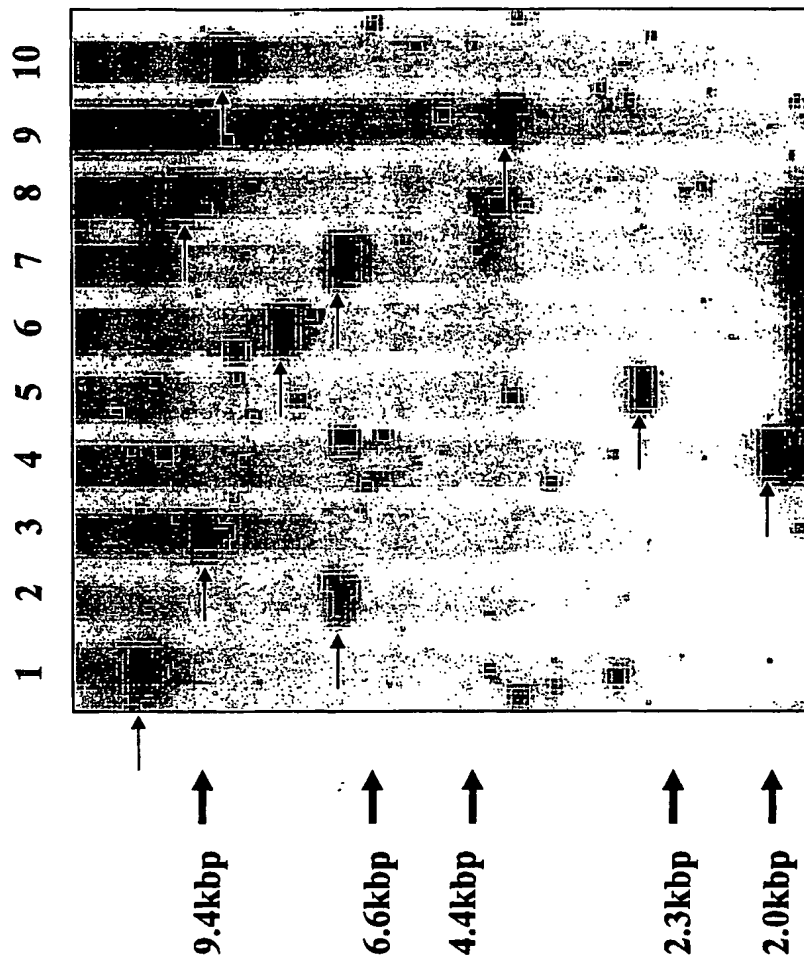


図 3

図 4

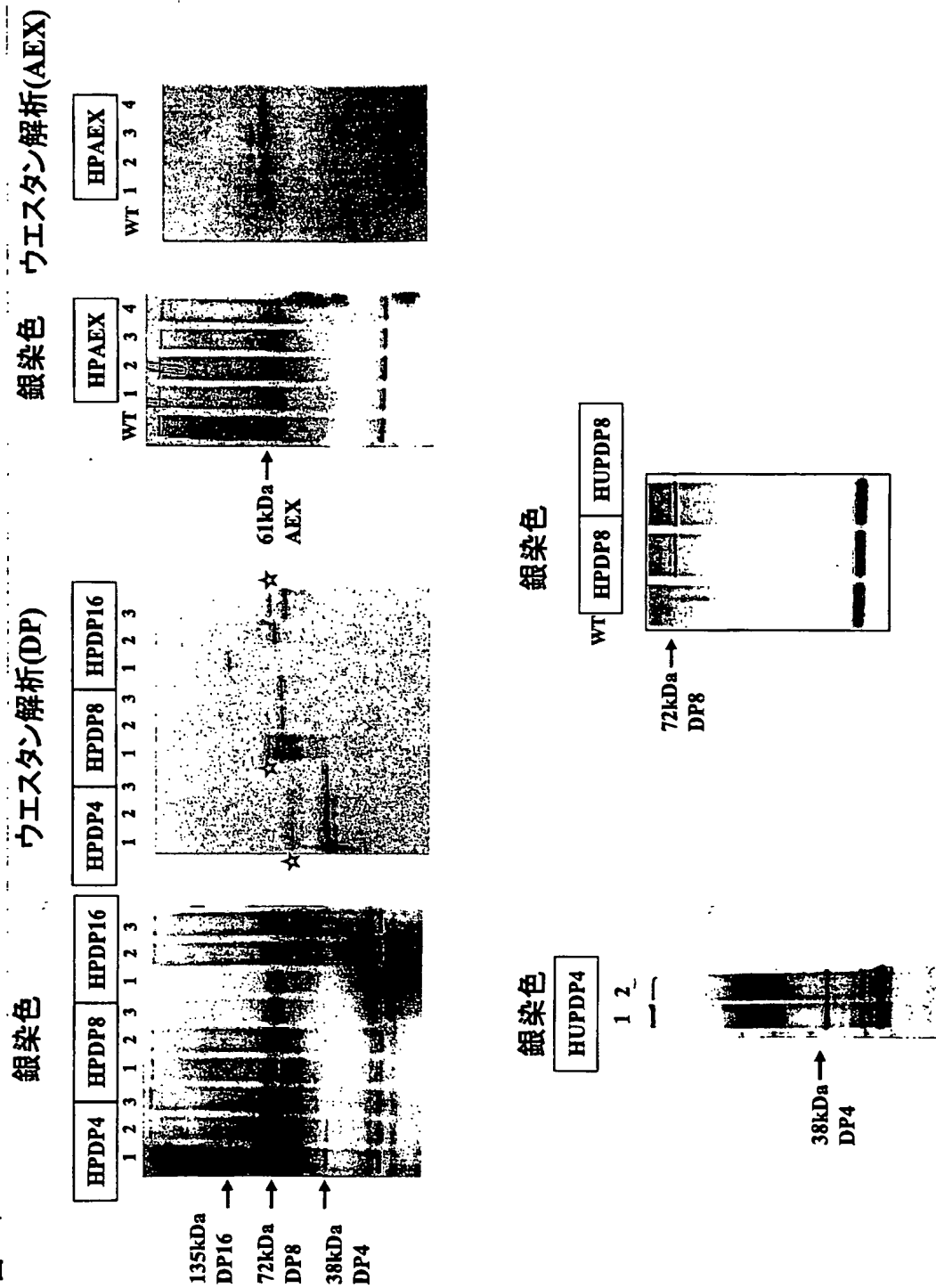
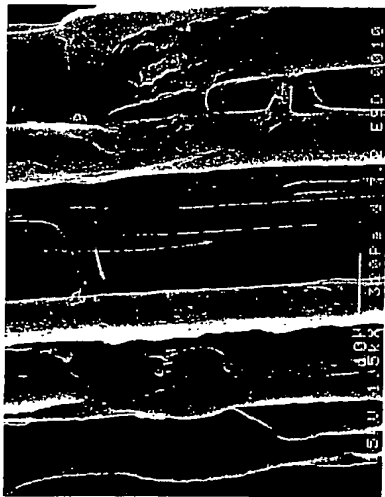


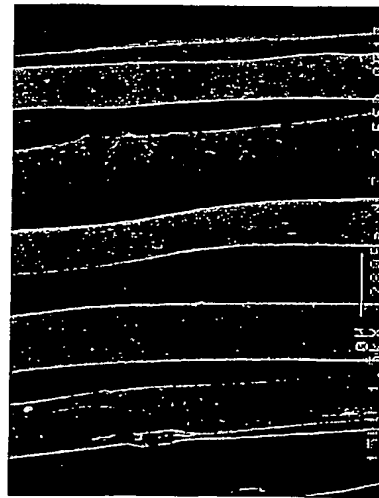
図 5



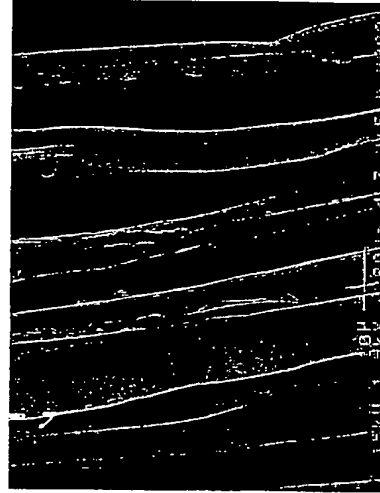
精練前非組換え絹糸



精練前HP・DP8・HC絹糸



精練後非組換え絹糸



精練後HP・DP8・HC絹糸

6/7

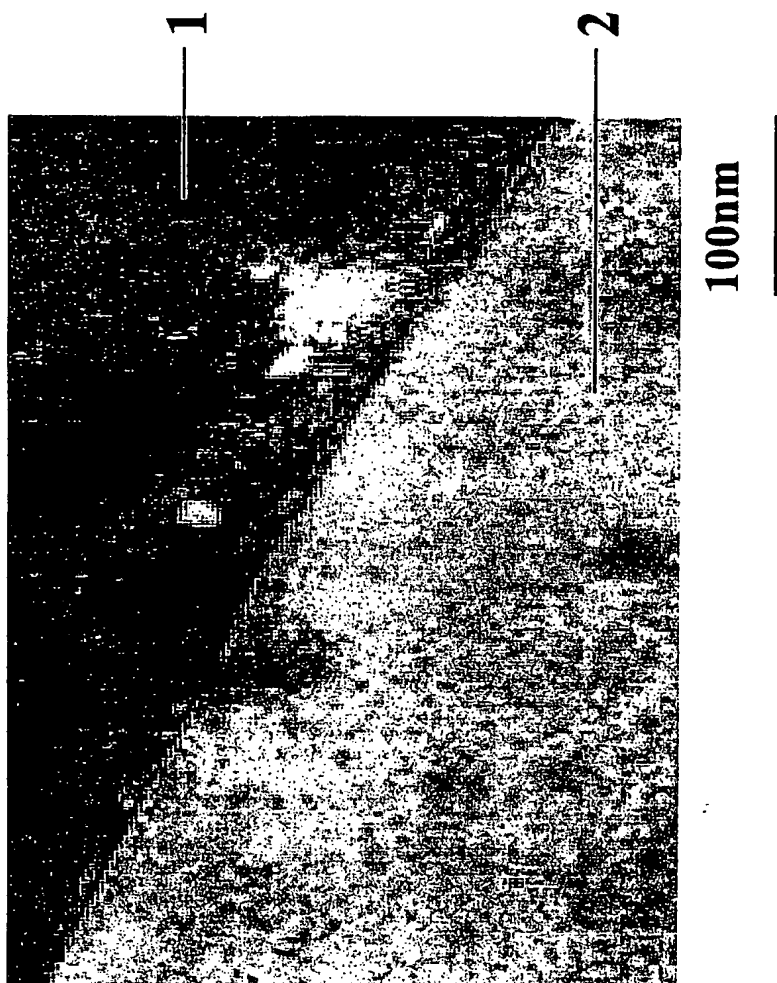
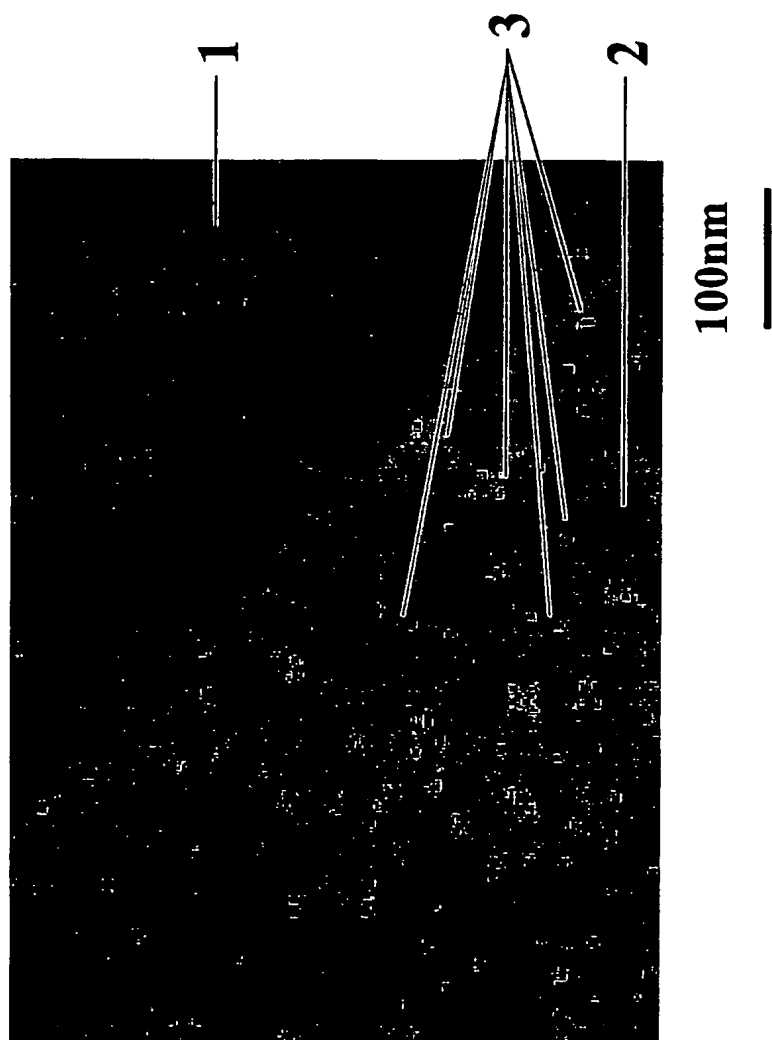


図 7





## SEQUENCE LISTING

<110> TORAY INDUSTRIES, INC.  
 <110> E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY  
 <120> SILK THREAD CONTAINING SPIDER SILK THREAD PROTEIN AND SILKWORM PRODUCING SAID  
 SILK THREAD  
 <130> FP1085SUBARU  
 <150> JP 2004-005489  
 <151> 2004-01-13  
 <160> 12

<210> 1  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 1  
 Ser Gln Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala  
 20 25 30  
 Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala  
 35 40 45  
 Gly Gln Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln  
 50 55 60  
 Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Gly Ala Gly Arg Gly Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gln Gly Gly  
 85 90 95  
 Tyr Gly Gly Leu Gly  
 100 101

<210> 2  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 2  
 Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ala Gly  
 20 25 30  
 Gly Ala Gly Gly Ser Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Tyr Gly  
 35 40 45  
 Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly  
 50 55 60  
 Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly  
 85 90 95 96

<210> 3  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Bombyx mori

&lt;400&gt; 3

Arg Ser Tyr Asp Tyr Ser Arg Arg Asn Val Arg Lys Asn Cys Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Arg Gln Leu Val Val Lys Phe Arg Ala Leu Pro Cys Val Asn  
 20 25 30  
 Cys  
 33

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bombyx mori

&lt;400&gt; 4

Met Arg Val Lys Thr Phe Val Ile Leu Cys Cys Ala Leu Gln Tyr Val  
 1 5 10 15  
 Ala Tyr Thr Asn Ala Asn Ile Asn Asp Phe Asp Glu Asp Tyr Phe Gly  
 20 25 30  
 Ser Asp Val  
 35

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 5

aatggcgcgc cgggagaaag catgaag 27

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 6

catggatccg acatcactcc caaaatagtc 30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 7

cccaatttgg cgcgcctcaa gacatccttg a 31

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 8

gaatgctacc tcgaggttat gaaaatg 27

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 9

gctggatccc gcagttacga ctattctcgt cgt 33

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 10

cttggcgcg cagcagctag acgtatagcc atcgg

35

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 11

Cys Gly Ala Gly Gln Gly Gly Tyr Gly Gly Leu Gly Ser Gln Ala Gly

1

5

10

15

Arg Gly

18

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 12

Cys Gly Pro Gly Gln Gln Gly Pro Gly Gly Tyr Gly Pro Gly Gln Gln

1

5

10

15

Gly Pro Ser

19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000619

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K14/435, D02G3/02, C12N15/09, A01K67/04, C12N5/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K14/435, D02G3/02, C12N15/09, A01K67/04, C12N5/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq,  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u>	US 2002/0137211 A (CHENGDU TIANYOU DEVELOPMENT CO., LTD.),	<u>1-3, 6-8, 18,</u>
Y	04 October, 2002 (04.10.02), & CN 1362520 A	<u>19, 23-26</u> 4, 5, 9-17, 20-22
<u>X</u>	Masao NAKAGAKI et al., "Kumo no Ito o Kaiko ni Hakaseru Kenkyu (Idenshi Targeting ni yoru Kasan Fibroin Idenshi no Kaizo)", Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Kagaku Kenkyuhi Hojokin (COE Keisei Kiso Kenkyuhi), 'Senshin Sen'i Gijutsu Kagaku ni Kansuru Kenkyu' (Kadai Bango 10CE2003) Seika Hokokusho VIII, Heisei 13 Nendo Seika Hokokusho, 14 March, 2002 (14.03.02), page 83	21, 22 1-20, 23-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25 March, 2005 (25.03.05)Date of mailing of the international search report  
12 April, 2005 (12.04.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000619

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u>	Toshiki TAMURA, "Idenshi Kumikae Kaiko to Shinsen'i", Kobunshi (2003), Vol.52, No.11, pages 822 to 825	<u>1, 2, 6-8, 19,</u> <u>25</u>
Y		3-5, 9-18, 20-24, 26
Y	US 6018030 A (PROTEIN POLYMER TECHNOLOGIES INC.), 25 January, 2000 (25.01.00), (Family: none)	1-26
Y	WO 94/29450 A (DU PONT DE NEMOURS & CO E I), 22 December, 1994 (22.12.94), & EP 707645 A & JP 8-511426 A & US 6268169 B	1-26
Y	Stefan WINKLER et al., Molecular biology of spider silk, Reviews in Molecular Biotechnology (2000), Vol.74, No.2, pages 85 to 93	1-26

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/435, D02G3/02, C12N15/09, A01K67/04, C12N5/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/435, D02G3/02, C12N15/09, A01K67/04, C12N5/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	US 2002/0137211 A (CHENGDU TIANYOU DEVELOPMENT CO. LTD.) 2002. 10. 04 & CN 1362520 A	<u>1-3, 6-8, 18, 19, 23-26</u> 4, 5, 9-17, 20-22
<u>X</u> Y	中垣雅雄, et. al., 蜘蛛の糸を蚕に吐かせる研究 (遺伝子ターゲティングによる家蚕フィブロイン遺伝子の改造), 文部科学省科学研究費補助金 (COE形成基礎研究費) 「先進繊維技術科学に関する研究」 (課題番号10CE2003) 成果報告書VIII 平成13年度成果報告書 (2002. 03. 14), p. 83	<u>21, 22</u> 1-20, 23-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 03. 2005

国際調査報告の発送日

12. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	田村俊樹, 遺伝子組換えカイコと新繊維, 高分子(2003), Vol. 52, NO. 11, p. 822-825	<u>1, 2, 6-8, 19, 25</u> 3-5, 9-18, 20-24, 26
Y	US 6018030 A (PROTEIN POLYMER TECHNOLOGIES INC) 2000. 01. 25 (ファミリーなし)	1 - 2 6
Y	WO 94/29450 A (DU PONT DE NEMOURS & CO E I) 1994. 12. 22 & EP 707645 A & JP 8-511426 A & US 6268169 B	1 - 2 6
Y	Stefan WINKLER, et. al., Molecular biology of spider silk, Reviews in Molecular Biotechnology (2000), Vol. 74, No. 2, p. 85-93	1 - 2 6